

**TABLE OF CONTENTS**

LIST OF TABLES ..... 1

LIST OF FIGURES ..... 1

本項で使用する用語・略語..... 2

1. まとめ..... 3

2. 分析法..... 4

3. 吸収..... 4

4. 分布..... 5

5. 代謝..... 7

6. 排泄..... 9

7. 薬物動態学的薬物相互作用..... 9

8. その他の薬物動態試験..... 9

9. 考察および結論..... 9

10. 図表..... 10

参考文献..... 10

**LIST OF TABLES**

Table 1 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の薬物動態 ..... 4

**LIST OF FIGURES**

Figure 1 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の血漿および肝臓中濃度..... 5

Figure 2 ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を筋肉内投与した BALB/c マウスにおける生体内発光..... 6

Figure 3 種々の動物種での ALC-0315 の推定生体内代謝経路 ..... 8

Figure 4 種々の動物種での ALC-0159 の推定生体内代謝経路 ..... 9





以上の非臨床薬物動態評価より、循環血中に到達した LNP は肝臓に分布することが示された。また、ALC-0315 および ALC-0159 の消失には、それぞれ代謝および糞中排泄が関与することが示唆された。

## 2. 分析法

報告書番号：PF-07302048\_06\_072424

GLP 非適用のラット静脈内投与 PK 試験 (M2.6.4.3 項) で LNP の構成脂質である ALC-0315 よび ALC-0159 濃度を定量するために適切な性能を有する LC/MS 法を開発した。すなわち、20 µL の血漿、肝ホモジネート (肝臓の 3 箇所から採取した切片を用いてホモジネートを調製し、それらをプールしたものを適宜、ブランクマトリクスで希釈)、尿および糞ホモジネート (適宜、ブランクマトリクスで希釈) 試料をそれぞれ内部標準物質 (PEG-2000) を含有するアセトニトリルで除タンパクした後、遠心分離し、その上清を LC-MS/MS 測定に供した。

## 3. 吸収

報告書番号：PF-07302048\_06\_072424, 概要表：2.6.5.3

ALC-0315 および ALC-0159 の体内動態を検討するため、ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を雄性 Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で単回静脈内投与し、経時的 (投与前、投与後 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 6 および 24 時間ならびに投与後 2, 4, 8 および 14 日) に血漿および肝臓をスパスサンプリングにより採取 (3 匹/時点) した。血漿中および肝臓中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定し、PK パラメータを算出した (Table 1)。血中の ALC-0315 および ALC-0159 は、投与後 24 時間までにすみやかに肝臓へ分布した。また、投与後 24 時間の血漿中濃度は最高血漿中濃度の 1%未満であった (Figure 1)。見かけの終末相消失半減期 ( $t_{1/2}$ ) は血漿中および肝臓中で同程度で、ALC-0315 は 6~8 日、ALC-0159 は 2~3 日であった。本試験の結果から、肝臓が血中からの ALC-0315 および ALC-0159 を取り込む主要組織の 1 つであることが示唆された。

本試験において実施した ALC-0315 および ALC-0159 の尿中および糞中濃度の検討結果については M2.6.4.6 項で述べる。

**Table 1** ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を Wistar Han ラットに 1 mg RNA/kg の用量で静脈内投与したときの ALC-0315 および ALC-0159 の薬物動態

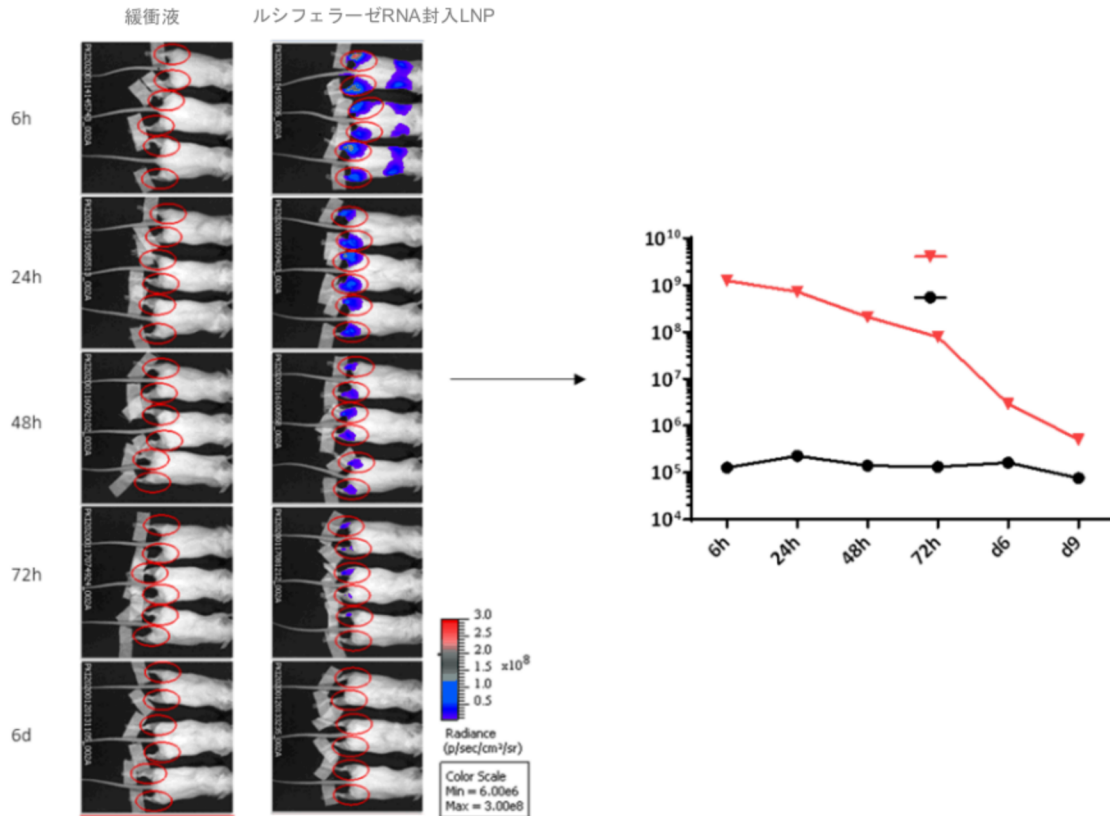
分析物	分析物の投与量 (mg/kg)	性/N	$t_{1/2}$ (h)	AUC <sub>inf</sub> (µg•h/mL)	AUC <sub>last</sub> (µg•h/mL)	肝臓への分布割合 (%) <sup>a</sup>
ALC-0315	15.3	雄/3 <sup>b</sup>	139	1030	1020	60
ALC-0159	1.96	雄/3 <sup>b</sup>	72.7	99.2	98.6	20

a. [最高肝臓分布量 (µg)] / [投与量 (µg)] として算出。

b. 各時点 3 匹。スパスサンプリング。



**Figure 2** ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を筋肉内投与した BALB/c マウスにおける生体内発光



雌雄 Wistar Han ラットに、<sup>[3H]</sup>-コレステリルヘキサデシルエーテル (<sup>[3H]</sup>-CHE) で標識した LNP を用いたルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を 50 μg RNA の用量で筋肉内投与し、投与後 15 分ならびに 1, 2, 4, 8, 24 および 48 時間の各時点において雌雄各 3 匹から血液、血漿および組織を採取し、液体シンチレーション計数法により放射能濃度を測定することで LNP の生体内分布を評価した。雌雄ともに、放射能濃度はいずれの測定時点においても投与部位が最も高値であった。血漿中の放射能濃度は投与後 1~4 時間で最も高値を示した。また、主に肝臓、脾臓、副腎および卵巣への分布がみられ、これらの組織において放射能濃度が最も高くなったのは投与後 8~48 時間であった。投与部位以外での投与量に対する総放射能回収率は肝臓で最も高く (最大 18%)、脾臓 (1.0%以下)、副腎 (0.11%以下) および卵巣 (0.095%以下) では肝臓と比較して著しく低かった。また、放射能の平均濃度および組織分布パターンは雌雄でおおむね類似していた。

BNT162b2 がコードする抗原の生体内発現分布は LNP 分布に依存すると考えられる。本試験で用いたルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の脂質の構成は、BNT162b2 の申請製剤と同一であることから、本試験結果は BNT162b2 封入 LNP の分布を示すと考えられる。

## 5. 代謝

報告書番号 : 01049-■■■■008, 01049-■■■■009, 01049-■■■■010, 01049-■■■■020, 01049-■■■■021, 01049-■■■■022,  
PF-07302048\_05■■■■■■■■■■\_043725, 概要表 : 2.6.5.10A, 2.6.5.10B, 2.6.5.10C, 2.6.5.10D

CD-1/ICR マウス, Wistar Han または Sprague Dawley ラット, カニクイザルならびにヒトの肝ミクロソーム, 肝 S9 画分および肝細胞を用いて, ALC-0315 および ALC-0159 の *in vitro* 代謝安定性を評価した。ALC-0315 または ALC-0159 を各動物種の肝ミクロソームまたは肝 S9 画分 (120 分間インキュベーション) もしくは肝細胞 (240 分間インキュベーション) に添加して, インキュベーション後の未変化体の割合を測定した。その結果, ALC-0315 および ALC-0159 はいずれの動物種・試験系でも代謝的に安定であり, 未変化体の最終的な割合は 82%超であった。

さらに ALC-0315 および ALC-0159 の代謝経路について *in vitro* および *in vivo* で評価した。これらの試験では, CD-1 マウス, Wistar Han ラット, カニクイザルおよびヒトの血液, 肝 S9 画分および肝細胞を用いて *in vitro* での代謝を評価した。また, ラット PK 試験で採取した血漿, 尿, 糞および肝臓試料を用い, *in vivo* での代謝を評価した (M2.6.4.3 項)。試験結果から, ALC-0315 と ALC-0159 の代謝はいずれも緩徐であり, それぞれエステル結合およびアミド結合の加水分解により代謝されることが明らかになった。Figure 3 および Figure 4 に示した加水分解による代謝は, 評価したすべての動物種でみられた。





Figure 4 種々の動物種での ALC-0159 の推定生体内代謝経路



H: ヒト, Mk: サル, Mo: マウス, R: ラット

ALC-0159 は、アミド結合の加水分解により *N,N*-ジテトラデシルアミン (*m/z* 410) が生成される経路が主要な代謝経路であった。この代謝物は、マウス・ラットの血液ならびにマウス・ラット・サル・ヒトの肝細胞および肝 S9 画分中に検出された。In vivo 試料からは ALC-0159 の代謝物は確認されなかった。

## 6. 排泄

ルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を 1 mg RNA/kg の用量でラットに静脈内投与した PK 試験 (M2.6.4.3 項) で経時的に採取した尿および糞中の ALC-0315 および ALC-0159 濃度を測定した。ALC-0315 および ALC-0159 の未変化体はいずれも尿中に検出されなかった。一方、糞中には ALC-0315 および ALC-0159 の未変化体が検出され、投与量当たりの割合はそれぞれ約 1% および約 50% であった。また、Figure 3 に示したように、ALC-0315 の代謝物が尿中で検出された。

## 7. 薬物動態学的薬物相互作用

本ワクチンの薬物動態学的薬物相互作用試験は実施していない。

## 8. その他の薬物動態試験

本ワクチンのその他の薬物動態試験は実施していない。

## 9. 考察および結論

ラット PK 試験において、血漿および肝臓中 ALC-0315 濃度は、投与後 2 週間までに最高濃度のそれぞれ約 7000 分の 1 および約 4 分の 1 に減少し、ALC-0159 濃度はそれぞれ約 8000 分の 1 および約 250 分の 1 に減少した。 $t_{1/2}$  は血漿中および肝臓中で同程度で、ALC-0315 は 6~8 日、ALC-0159 は 2~3 日であった。血漿中  $t_{1/2}$  値は、それぞれの脂質が LNP として組織中に分布し、その後、消失過程で血漿中に再分布したことを表すと考えられる。

ALC-0315 の未変化体は尿中と糞中のいずれにもほとんど検出されなかったが、ラット PK 試験で採取した糞および血漿試料からモノエステル代謝物、二重脱エステル化代謝物および 6-ヘキシルデカン酸が、尿からは二重脱エステル化代謝物のグルクロン酸抱合体が検出された。この代謝過程が ALC-0315 の主要消失機序と考えられるが、この仮説を検証する定量データは得られていない。一方、ALC-0159 は投与量の約 50% が未変化体として糞中に排泄された。In vitro 代謝実験において、アミド結合の加水分解により緩徐に代謝された。

BNT162b2 がコードする抗原の生体内発現分布は LNP 分布に依存すると考えられることから、BALB/c マウスにルシフェラーゼ RNA 封入 LNP を筋肉内投与し、代替レポータータンパク質の生体内分布を検討した。その結果、ルシフェラーゼの発現が投与部位においてみられ、それより発現量は低値であったものの肝臓でも認められた。ルシフェラーゼの投与部位での発現は投与後 6 時間から認められ、投与後 9 日には消失した。肝臓での発現は投与後 6 時間から認められ、投与後 48 時間までに消失した。肝臓への分布は局所投与したルシフェラーゼ RNA 封入 LNP が循環血中に到達し、肝臓で取り込まれたことを示すものと考えられた。また、ラットにルシフェラーゼ RNA 封入 LNP の放射能標識体を筋肉内投与したところ、放射能濃度は投与部位で最も高値を示した。投与部位以外では、肝臓で最も高く、次いで脾臓、副腎および卵巣でも検出されたが、これらの組織における投与量に対する総放射能回収率は肝臓より著しく低かった。この結果は、マウス生体内分布試験において肝臓でルシフェラーゼ発現がみられたことと符合した。なお、ラット反復投与毒性試験で肝障害を示す毒性所見は認められなかった (M2.6.6.3 項)。

以上の非臨床薬物動態評価より、循環血中に到達した LNP は肝臓に分布することが示された。また、ALC-0315 および ALC-0159 の消失には、それぞれ代謝および糞中排泄が関与することが示唆された。

## 10. 図表

図表は本文中および概要表に示した。

## 参考文献

- 1 World Health Organization. Annex 1. Guidelines on the nonclinical evaluation of vaccines. In: WHO Technical Report Series No. 927, Geneva, Switzerland. World Health Organization; 2005:31-63.
- 2 感染症予防ワクチンの非臨床試験ガイドラインについて(薬食審査発 0527 第 1 号, 平成 22 年 5 月 27 日)

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)  
 2.6.5 薬物動態試験の概要表

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Test Article: BNT162b2

Type of Study	Test System	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
<b>Single Dose Pharmacokinetics</b>					
Single Dose Pharmacokinetics and Excretion in Urine and Feces of ALC-0159 and ALC-0315	Rat (Wistar Han)	modRNA encoding luciferase formulated in LNP comparable to BNT162b2	IV bolus	Pfizer Inc <sup>a</sup>	PF-07302048_06-██████_072424
<b>Distribution</b>					
In Vivo Distribution	Mice BALB/c	modRNA encoding luciferase formulated in LNP comparable to BNT162b2	IM Injection	██████ <sup>b</sup>	R-██████-0072
In Vivo Distribution	Rat (Wistar Han)	modRNA encoding luciferase formulated in LNP comparable to BNT162b2 with trace amounts of [ <sup>3</sup> H]-CHE as non-diffusible label	IM Injection	██████ <sup>c</sup>	185350
<b>Metabolism</b>					
<b>In Vitro and In Vivo Metabolism</b>					
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0315 in Liver Microsomes	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley and Wistar Han), monkey (Cynomolgus), and human liver microsomes	ALC-0315	In vitro	██████████ <sup>d</sup>	01049-██████008
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0315 in Liver S9	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley), monkey (Cynomolgus), and human S9 liver fractions	ALC-0315	In vitro	██████████ <sup>d</sup>	01049-██████009

2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW

Test Article: BNT162b2

Type of Study	Test System	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0315 in Hepatocytes	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley and Wistar Han), monkey (Cynomolgus), and human hepatocytes	ALC-0315	In vitro	[REDACTED]	01049-[REDACTED]010
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0159 in Liver Microsomes	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley and Wistar Han), monkey (Cynomolgus), and human liver microsomes	ALC-0159	In vitro	[REDACTED]	01049-[REDACTED]020
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0159 in Liver S9	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley), monkey (Cynomolgus), and human S9 fractions	ALC-0159	In vitro	[REDACTED]	01049-[REDACTED]021
In Vitro Metabolic Stability of ALC-0159 in Hepatocytes	Mouse (CD-1/ICR), rat (Sprague Dawley and Wistar Han), monkey (Cynomolgus), and human hepatocytes	ALC-0159	In vitro	[REDACTED]	01049-[REDACTED]022
Biotransformation of ALC-0159 and ALC-0315 In Vitro and In Vivo in Rats	In vitro: CD-1 mouse, Wistar Han rat, cynomolgus monkey, and human blood, liver S9 fractions and hepatocytes In vivo: male Wistar Han rats	ALC-0315 and ALC-0159	In vitro or IV (in vivo in rats)	Pfizer Inc <sup>e</sup>	PF-07302048_05-[REDACTED]_043725

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.1. PHARMACOKINETICS OVERVIEW**

**Test Article: BNT162b2**

Type of Study	Test System	Test item	Method of Administration	Testing Facility	Report Number
<p>ALC-0159 = 2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide, a proprietary polyethylene glycol-lipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; ALC-0315 = (4-hydroxybutyl)azanediylbis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), a proprietary aminolipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; IM = Intramuscular; IV = Intravenous; LNP = lipid nanoparticles; S9 = Supernatant fraction obtained from liver homogenate by centrifuging at 9000 g.</p> <p>a. La Jolla, California.                      b. [REDACTED], Germany.                      c. [REDACTED], UK.                      d. [REDACTED], China.                      e. Groton, Connecticut.</p>					

**2.6.5.3. PHARMACOKINETICS:  
PHARMACOKINETICS AFTER A SINGLE DOSE**
**Test Article: modRNA encoding luciferase in LNP  
Report Number: PF-07302048\_06 [REDACTED]\_072424**

		Rat (Wistar Han)	
Species (Strain)		Male/ 3 animals per timepoint <sup>a</sup>	
Sex/Number of Animals		Fasted	
Feeding Condition		IV	
Method of Administration		1	
Dose modRNA (mg/kg)		1.96	
Dose ALC-0159 (mg/kg)		15.3	
Dose ALC-0315 (mg/kg)		Plasma, liver, urine and feces	
Sample Matrix		Predose, 0.1, 0.25, 0.5, 1, 3, 6, 24, 48, 96, 192, 336	
Sampling Time Points (h post dose):			
Analyte	ALC-0315		ALC-0159
PK Parameters:	Mean <sup>b</sup>		Mean <sup>b</sup>
AUC <sub>inf</sub> (µg•h/mL) <sup>c</sup>	1030		99.2
AUC <sub>last</sub> (µg•h/mL)	1020		98.6
Initial t <sub>1/2</sub> (h) <sup>d</sup>	1.62		1.74
Terminal elimination t <sub>1/2</sub> (h) <sup>e</sup>	139		72.7
Estimated fraction of dose distributed to liver (%) <sup>f</sup>	59.5		20.3
Dose in Urine (%)	NC <sup>g</sup>		NC <sup>g</sup>
Dose in Feces (%) <sup>h</sup>	1.05		47.2

ALC-0159 = 2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide, a proprietary polyethylene glycol-lipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; ALC-0315 = (4-hydroxybutyl)azanediylbis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), a proprietary aminolipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; AUC<sub>inf</sub> = Area under the plasma drug concentration-time curve from 0 to infinite time; AUC<sub>last</sub> = Area under the plasma drug concentration-time curve from 0 to the last quantifiable time point; BLQ = Below the limit of quantitation; LNP = Lipid nanoparticle; modRNA = Nucleoside modified messenger RNA; PK = Pharmacokinetics; t<sub>1/2</sub> = Half-life.

a. Non-serial sampling, 36 animals total.

b. Only mean PK parameters are reported due to non-serial sampling.

c. Calculated using the terminal log-linear phase (determined using 48, 96, 192, and 336 h for regression calculation).

d. ln(2)/initial elimination rate constant (determined using 1, 3, and 6 h for regression calculation).

e. ln(2)/terminal elimination rate constant (determined using 48, 96, 192, and 336 h for regression calculation).

f. Calculated as follows: highest mean amount in the liver (µg)/total mean dose (µg) of ALC-0315 or ALC-0159.

g. Not calculated due to BLQ data.

h. Fecal excretion, calculated as: (mean µg of analyte in feces/ mean µg of analyte administered) × 100

## 2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.5A. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION****Test Article: modRNA encoding luciferase in LNP  
Report Number: R-0072**

Species (Strain):	Mice (BALB/c)
Sex/Number of Animals:	Female/3 per group
Feeding Condition:	Fed ad libitum
Vehicle/Formulation:	Phosphate-buffered saline
Method of Administration:	Intramuscular injection
Dose (mg/kg):	1 µg/hind leg in gastrocnemius muscle (2 µg total)
Number of Doses:	1
Detection:	Bioluminescence measurement
Sampling Time (hour):	6, 24, 48, 72 hours; 6 and 9 days post-injection

Time point	Total Mean Bioluminescence signal (photons/second)		Mean Bioluminescence signal in the liver (photons/second)
	Buffer control	modRNALuciferase in LNP	modRNALuciferase in LNP
6 hours	$1.28 \times 10^5$	$1.26 \times 10^9$	$4.94 \times 10^7$
24 hours	$2.28 \times 10^5$	$7.31 \times 10^8$	$2.4 \times 10^6$
48 hours	$1.40 \times 10^5$	$2.10 \times 10^8$	Below detection <sup>a</sup>
72 hours	$1.33 \times 10^5$	$7.87 \times 10^7$	Below detection <sup>a</sup>
6 days	$1.62 \times 10^5$	$2.92 \times 10^6$	Below detection <sup>a</sup>
9 days	$7.66 \times 10^4$	$5.09 \times 10^5$	Below detection <sup>a</sup>

LNP = Lipid nanoparticle; modRNA = Nucleoside modified messenger RNA.

a. At or below the background level of the buffer control.

**2.6.5.5B. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION CONTINUED**

**Test Article: [<sup>3</sup>H]-Labelled LNP-mRNA formulation containing ALC-0315 and ALC-0159**  
**Report Number: 185350**

Species (Strain):	Rat (Wistar Han)													
Sex/Number of Animals:	Male and female/3 animals/sex/timepoint (21 animals/sex total for the 50 µg dose)													
Feeding Condition:	Fed ad libitum													
Method of Administration:	Intramuscular injection													
Dose:	50 µg [ <sup>3</sup> H]-08-A01-C0 (lot # NC-0552-1)													
Number of Doses:	1													
Detection:	Radioactivity quantitation using liquid scintillation counting													
Sampling Time (hour):	0.25, 1, 2, 4, 8, 24, and 48 hours post-injection													
Sample	Mean total lipid concentration (µg lipid equivalent/g (or mL) (males and females combined))							% of administered dose (males and females combined)						
	0.25 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	0.25 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Adipose tissue	0.057	0.100	0.126	0.128	0.093	0.084	0.181	--	--	--	--	--	--	--
Adrenal glands	0.271	1.48	2.72	2.89	6.80	13.8	18.2	0.001	0.007	0.010	0.015	0.035	0.066	0.106
Bladder	0.041	0.130	0.146	0.167	0.148	0.247	0.365	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.002
Bone (femur)	0.091	0.195	0.266	0.276	0.340	0.342	0.687	--	--	--	--	--	--	--
Bone marrow (femur)	0.479	0.960	1.24	1.24	1.84	2.49	3.77	--	--	--	--	--	--	--
Brain	0.045	0.100	0.138	0.115	0.073	0.069	0.068	0.007	0.013	0.020	0.016	0.011	0.010	0.009
Eyes	0.010	0.035	0.052	0.067	0.059	0.091	0.112	0.000	0.001	0.001	0.002	0.002	0.002	0.003
Heart	0.282	1.03	1.40	0.987	0.790	0.451	0.546	0.018	0.056	0.084	0.060	0.042	0.027	0.030
Injection site	128	394	311	338	213	195	165	19.9	52.6	31.6	28.4	21.9	29.1	24.6
Kidneys	0.391	1.16	2.05	0.924	0.590	0.426	0.425	0.050	0.124	0.211	0.109	0.075	0.054	0.057
Large intestine	0.013	0.048	0.093	0.287	0.649	1.10	1.34	0.008	0.025	0.065	0.192	0.405	0.692	0.762
Liver	0.737	4.63	11.0	16.5	26.5	19.2	24.3	0.602	2.87	7.33	11.9	18.1	15.4	16.2
Lung	0.492	1.21	1.83	1.50	1.15	1.04	1.09	0.052	0.101	0.178	0.169	0.122	0.101	0.101



## 2.6.5 薬物動態試験の概要表

## 2.6.5.5B. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION CONTINUED

Test Article: [<sup>3</sup>H]-Labelled LNP-mRNA formulation containing ALC-0315 and ALC-0159  
Report Number: 185350

Sample	Total Lipid concentration (µg lipid equivalent/g [or mL]) (males and females combined)							% of Administered Dose (males and females combined)						
	0.25 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h	0.25 h	1 h	2 h	4 h	8 h	24 h	48 h
Lymph node (mandibular)	0.064	0.189	0.290	0.408	0.534	0.554	0.727	--	--	--	--	--	--	--
Lymph node (mesenteric)	0.050	0.146	0.530	0.489	0.689	0.985	1.37	--	--	--	--	--	--	--
Muscle	0.021	0.061	0.084	0.103	0.096	0.095	0.192	--	--	--	--	--	--	--
Ovaries (females)	0.104	1.34	1.64	2.34	3.09	5.24	12.3	0.001	0.009	0.008	0.016	0.025	0.037	0.095
Pancreas	0.081	0.207	0.414	0.380	0.294	0.358	0.599	0.003	0.007	0.014	0.015	0.015	0.011	0.019
Pituitary gland	0.339	0.645	0.868	0.854	0.405	0.478	0.694	0.000	0.001	0.001	0.001	0.000	0.000	0.001
Prostate (males)	0.061	0.091	0.128	0.157	0.150	0.183	0.170	0.001	0.001	0.002	0.003	0.003	0.004	0.003
Salivary glands	0.084	0.193	0.255	0.220	0.135	0.170	0.264	0.003	0.007	0.008	0.008	0.005	0.006	0.009
Skin	0.013	0.208	0.159	0.145	0.119	0.157	0.253	--	--	--	--	--	--	--
Small intestine	0.030	0.221	0.476	0.879	1.28	1.30	1.47	0.024	0.130	0.319	0.543	0.776	0.906	0.835
Spinal cord	0.043	0.097	0.169	0.250	0.106	0.085	0.112	0.001	0.002	0.002	0.003	0.001	0.001	0.001
Spleen	0.334	2.47	7.73	10.3	22.1	20.1	23.4	0.013	0.093	0.325	0.385	0.982	0.821	1.03
Stomach	0.017	0.065	0.115	0.144	0.268	0.152	0.215	0.006	0.019	0.034	0.030	0.040	0.037	0.039
Testes (males)	0.031	0.042	0.079	0.129	0.146	0.304	0.320	0.007	0.010	0.017	0.030	0.034	0.074	0.074
Thymus	0.088	0.243	0.340	0.335	0.196	0.207	0.331	0.004	0.007	0.010	0.012	0.008	0.007	0.008
Thyroid	0.155	0.536	0.842	0.851	0.544	0.578	1.00	0.000	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001	0.001
Uterus (females)	0.043	0.203	0.305	0.140	0.287	0.289	0.456	0.002	0.011	0.015	0.008	0.016	0.018	0.022
Whole blood	1.97	4.37	5.40	3.05	1.31	0.909	0.420	--	--	--	--	--	--	--
Plasma	3.97	8.13	8.90	6.50	2.36	1.78	0.805	--	--	--	--	--	--	--
Blood:Plasma ratio <sup>a</sup>	0.815	0.515	0.550	0.510	0.555	0.530	0.540	--	--	--	--	--	--	--

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.5B. PHARMACOKINETICS: ORGAN DISTRIBUTION CONTINUED**

**Test Article: [<sup>3</sup>H]-Labelled LNP-mRNA formulation containing ALC-0315 and ALC-0159  
Report Number: 185350**

-- = Not applicable, partial tissue taken; [<sup>3</sup>H]-08-A01-C0 = An aqueous dispersion of LNPs, including ALC-0315, ALC-0159, distearoylphosphatidylcholine, cholesterol, mRNA encoding luciferase and trace amounts of radiolabeled [Cholesteryl-1,2-3H(N)]-Cholesteryl Hexadecyl Ether, a nonexchangeable, non-metabolizable lipid marker used to monitor the disposition of the LNPs; ALC-0159 = 2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide, a proprietary polyethylene glycol-lipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; ALC-0315 = (4--hydroxybutyl)azanediyl)bis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), a proprietary aminolipid included as an excipient in the LNP formulation used in BNT162b2; LNP = Lipid nanoparticle; mRNA = messenger RNA.

a. The mean male and female blood:plasma values were first calculated separately and this value represents the mean of the two values.

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.9. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VIVO, RAT**

**Test Article: modRNA encoding luciferase in LNP**  
**Report Number: PF-07302048\_05[REDACTED]\_043725**

Species (Strain): Rat (Wistar Han)  
 Sex/ Number of animals: Male/ 36 animals total for plasma and liver, 3 animals for urine and feces  
 Method of Administration: Intravenous  
 Dose (mg/kg): 1  
 Test System: Plasma, Urine, Feces, Liver  
 Analysis Method: Ultrahigh performance liquid chromatography/ mass spectrometry

Biotransformation	m/z	Metabolites of ALC-0315 Detected			
		Plasma	Urine	Feces	Liver
<i>N</i> -dealkylation, oxidation	102.0561 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -Dealkylation, oxidation	104.0706 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -dealkylation, oxidation	130.0874 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -Dealkylation, oxidation	132.1019 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -dealkylation, hydrolysis, oxidation	145.0506 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis (acid)	255.2330 <sup>a</sup>	+	ND	ND	ND
Hydrolysis, hydroxylation	271.2279 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine)	290.2690 <sup>b</sup>	+	+	+	+
Hydrolysis, glucuronidation	431.2650 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine), glucuronidation	464.2865 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine), glucuronidation	466.3011 <sup>b</sup>	ND	+	ND	ND
Hydrolysis (amine)	528.4986 <sup>b</sup>	+	ND	ND	+
Hydrolysis (amine), Glucuronidation	704.5307 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Oxidation to acid	778.6930 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Oxidation to acid	780.7076 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Hydroxylation	782.7232 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Sulfation	844.6706 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Sulfation	846.6851 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND
Glucuronidation	940.7458 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND
Glucuronidation	942.7604 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND

Note: Both theoretical and observed metabolites are included.  
 m/z = mass to charge ratio; ND = Not detected; + = minor metabolite as assessed by ultraviolet detection.  
 a. Negative ion mode.  
 b. Positive ion mode.

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

2.6.5.10A. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO

Test Article: ALC-0315  
 Report Numbers: 01049-008  
 01049-009  
 01049-010

Incubation time (min)	Liver Microsomes					Liver S9 Fraction				Hepatocytes				
	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Rat (WH)	Monkey (Cyno)	Human	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Monkey (Cyno)	Human	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Rat (WH)	Monkey (Cyno)	Human
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	98.77	94.39	96.34	97.96	100.24	97.69	98.85	99.57	95.99	--	--	--	--	--
30	97.78	96.26	97.32	96.18	99.76	97.22	99.62	96.96	97.32	101.15	97.75	102.70	96.36	100.72
60	100.49	99.73	98.54	100.00	101.45	98.61	99.62	99.13	94.98	100.77	98.50	102.32	97.82	101.44
90	97.78	98.66	94.15	97.96	100.48	98.15	98.85	98.70	98.33	101.92	99.25	103.09	100.0	100.36
120	96.54	95.99	93.66	97.71	98.31	96.76	98.46	99.57	99.33	98.85	97.38	99.61	96.36	100.72
180	--	--	--	--	--	--	--	--	--	101.15	98.88	103.47	95.64	98.92
240	--	--	--	--	--	--	--	--	--	99.62	101.12	100.00	93.82	99.64
t <sub>1/2</sub> (min)	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>240	>240	>240	>240	>240

-- = Data not available; ALC-0315 = (4-hydroxybutyl)azanediylbis(hexane-6,1-diyl)bis(2-hexyldecanoate), a proprietary aminolipid included as an excipient in the lipid nanoparticle formulation used in BNT162b2; Cyno = Cynomolgus; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC = not calculated; SD = Sprague Dawley; t<sub>1/2</sub> = half-life; WH = Wistar-Han; UDPGA= uridine-diphosphate-glucuronic acid trisodium salt.

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.10B. PHARMACOKINETICS: METABOLISM IN VITRO  
CONTINUED**

**Test Article: ALC-0159**  
**Report Numbers: 01049-020**  
**01049-021**  
**01049-022**

Type of Study:	Liver Microsomes + NADPH		Stability of ALC-0159 In Vitro S9 Fraction + NADPH, UDPGA, and alamethicin				Hepatocytes							
Study System:														
ALC-0159 Concentration:	1 μM		1 μM				1 μM							
Duration of Incubation (min):	120 min		120 min				240 min							
Analysis Method:	Ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry													
Incubation time (min)	Liver Microsomes					Liver S9 Fraction				Hepatocytes				
	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Rat (WH)	Monkey (Cyno)	Human	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Monkey (Cyno)	Human	Mouse (CD-1/ICR)	Rat (SD)	Rat (WH)	Monkey (Cyno)	Human
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
15	82.27	101.24	112.11	100.83	99.59	98.93	84.38	91.30	106.73	--	--	--	--	--
30	86.40	93.78	102.69	85.12	92.28	91.10	90.87	97.96	107.60	100.85	93.37	113.04	90.23	106.34
60	85.54	98.34	105.38	86.36	95.53	102.85	97.97	105.56	104.97	94.92	91.81	105.07	92.93	101.58
90	85.41	95.44	100.90	94.63	97.97	90.75	93.51	108.33	109.36	94.28	90.25	112.80	94.59	92.67
120	95.87	97.10	108.97	93.39	93.09	106.76	92.70	105.74	119.59	87.08	89.47	104.11	97.51	96.04
180	--	--	--	--	--	--	--	--	--	94.92	93.96	102.90	89.81	93.66
240	--	--	--	--	--	--	--	--	--	102.75	94.93	98.79	92.93	102.57
t <sub>1/2</sub> (min)	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>120	>240	>240	>240	>240	>240

-- = Data not available; ALC-0159 = 2-[(polyethylene glycol)-2000]-N,N-ditetradecylacetamide, a proprietary polyethylene glycol-lipid included as an excipient in the lipid nanoparticle formulation used in BNT162b2; Cyno = Cynomolgus; NADPH = Reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NC = not calculated; SD = Sprague Dawley; WH = Wistar-Han; UDPGA= uridine-diphosphate-glucuronic acid trisodium salt.

SARS-CoV-2 mRNA Vaccine (BNT162, PF-07302048)

2.6.5 薬物動態試験の概要表

**2.6.5.10C. PHARMACOKINETICS: METABOLISM  
IN VITRO CONTINUED**

**Test Article: ALC-0315**  
**Report Number: PF-07302048\_05 [REDACTED] \_043725**

Type of study		Metabolism of ALC-0315 In Vitro											
Study system		Blood				Hepatocytes				Liver S9 Fraction			
ALC-0315 concentration		10 µM				10 µM				10 µM			
Duration of incubation		24 h				4 h				24 h			
Analysis Method:		Ultrahigh performance liquid chromatography/ mass spectrometry											
Biotransformation	m/z	Blood				Hepatocytes				Liver S9 Fraction			
		Mouse	Rat	Monkey	Human	Mouse	Rat	Monkey	Human	Mouse	Rat	Monkey	Human
N-dealkylation, oxidation	102.0561 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-Dealkylation, oxidation	104.0706 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-dealkylation, oxidation	130.0874 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-Dealkylation, oxidation	132.1019 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
N-dealkylation, hydrolysis, oxidation	145.0506 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis (acid)	255.2330 <sup>a</sup>	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	ND	+
Hydrolysis, hydroxylation	271.2279 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine)	290.2690 <sup>b</sup>	+	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
Hydrolysis, glucuronidation	431.2650 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine), glucuronidation	464.2865 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Bis-hydrolysis (amine), glucuronidation	466.3011 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis (amine)	528.4986 <sup>b</sup>	ND	+	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	+	ND
Hydrolysis (amine), glucuronidation	704.5307 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidation to acid	778.6930 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Oxidation to acid	780.7076 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydroxylation	782.7232 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfation	844.6706 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sulfation	846.6851 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glucuronidation	940.7458 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Glucuronidation	942.7604 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Note: Both theoretical and observed metabolites are included.  
m/z = mass to charge ratio; ND = Not detected; + = metabolite present.  
a. Negative ion mode.  
b. Positive ion mode.

## 2.6.5 薬物動態試験の概要表

2.6.5.10D. PHARMACOKINETICS: METABOLISM  
IN VITRO CONTINUEDTest Article: ALC-0159  
Report Number: PF-07302048\_05\_043725

Type of study		Metabolism of ALC-0159 In Vitro											
Study system		Blood				Hepatocytes				Liver S9 Fraction			
ALC-0159 concentration		10 µM				10 µM				10 µM			
Duration of incubation		24 h				4 h				24 h			
Analysis Method:		Ultrahigh performance liquid chromatography/ mass spectrometry											
Biotransformation	m/z	Blood				Hepatocytes				Liver S9 Fraction			
		Mouse	Rat	Monkey	Human	Mouse	Rat	Monkey	Human	Mouse	Rat	Monkey	Human
<i>O</i> -Demethylation, <i>O</i> -dealkylation	107.0703 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>O</i> -Demethylation, <i>O</i> -dealkylation	151.0965 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>O</i> -Demethylation, <i>O</i> -dealkylation	195.1227 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis, <i>N</i> -Dealkylation	214.2529 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -Dealkylation, oxidation	227.2017 <sup>a</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis (amine)	410.4720 <sup>b</sup>	+	+	ND	ND	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>N,N</i> -Didealkylation	531.5849 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>N</i> -Dealkylation	580.6396 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
<i>O</i> -Demethylation, oxidation	629.6853 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydroxylation	633.6931 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
$\omega$ -Hydroxylation, Oxidation	637.1880 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Hydrolysis (acid)	708.7721 <sup>b</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Note: Both theoretical and observed metabolites are included.

m/z = mass to charge ratio; ND = Not detected; + = metabolite present.

a. Negative ion mode.

b. Positive ion mode.